

SOLUBILIZATION OF PROTEINS FOR PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS USING POLYMER CONJUGATION

Patent Number: WO8700056

Publication date: 1987-01-15

Inventor(s): KATRE NANDINI (US); KNAUF MICHAEL J (US)

Applicant(s): CETUS CORP (US)

Requested Patent: JP2524586B2

Application Number: WO1986US01252 19860606

Priority Number(s): US19850749955 19850626

IPC Classification: A61K47/00; A61K45/02; A61K37/02; A61K39/395; C07K17/08

EC Classification: A61K47/48H4P, A61K47/48T2C12P2F2, C07K1/107D4, A61K38/20B, A61K38/21B

Equivalents: AU5970086, CA1291708, DE3676670D, DK169874B, DK97987, EP0229108
(WO8700056), B1, FI870809, FI93424B, FI93424C, GR861641,
IE59406, IE861706L, IL79235, IN163200, KR9004801, MX174442, NZ216618,
PH25004, PT82834, ZA8604766

Cited patent(s): EP0154316; EP0098110; US4414147; US4179337

Abstract

A pharmaceutical composition wherein a biologically active conjugated protein which is beta -interferon, interleukin-2, or an immunotoxin is dissolved in an aqueous carrier medium without the presence of a solubilizing agent. The unconjugated protein, which is not water-soluble at pH 6-8 without such solubilizing agent, is selectively conjugated to a water-soluble polymer selected from polyethylene glycol homopolymers or polyoxyethylated polyols.

Data supplied from the **esp@cenet** database - I2

⑫ 公表特許公報 (A)

昭62-503171

⑬ Int.CI.¹
A 61 K 37/02
45/02
47/00

識別記号
3 4 8

序内整理番号
8615-4C
7252-4C
G-6742-4C
B-6742-4C

⑭ 公表 昭和62年(1987)12月17日
審査請求 未請求
予備審査請求 未請求
部門(区分) 3 (2)
(全 18 頁)

⑮ 発明の名称 ポリマー接合を利用する医薬組成物用蛋白質の可溶化

⑯ 特 願 昭61-503399
⑰ 出 願 昭61(1986)6月6日

⑮ 翻訳文提出日 昭62(1987)2月26日

⑯ 国際出願 PCT/US86/01252

⑰ 國際公開番号 WO87/00056

⑱ 國際公開日 昭62(1987)1月15日

優先権主張 ⑯ 1985年6月26日 ⑮ 米国(US)⑰ 749955

⑲ 発明者 カトル, ナンディニ

アメリカ合衆国, カリフォルニア 94530, エル セリト, ジョーダン アベニュー 6107

⑲ 発明者 ナウフ, ミツシエル ジエイ

アメリカ合衆国, カリフォルニア 94066, サンブルノ, ツラードライブ 121

⑲ 出願人 シタス コーポレイション

アメリカ合衆国, カリフォルニア 94608, エミリービル, フィフティーサード ストリート 1400

⑲ 代理人 弁理士 青木 朗 外5名

⑲ 指定国 AT(広域特許), AU, BE(広域特許), CH(広域特許), DE(広域特許), DK, FI, FR(広域特許), GB(広域特許), IT(広域特許), JP, LU(広域特許), NL(広域特許), NO, SE(広域特許)

請求の範囲

1. 非毒性で不活性な医薬として許容される水性キャリヤー媒体を含んで成る医薬組成物であって、該媒体中に β -インターフェロン、インターロイキン-2 及びイムノトキシンから成る群から選ばれた生物学的に活性な選択的に接合した蛋白質が溶解しており、該蛋白質はポリエチレングリコールホモポリマー及びポリオキシエチル化ポリオールから成る群から選ばれた水溶性ポリマーに共有結合的に接合しており、該水溶性ポリマーは置換されていないか又は一端においてアルキル基により置換されておりして該ポリオールは置換されておらず、そして前記蛋白質はその接合していない形において通常は疎水性でありして可溶化剤の非存在下でpH 6~8の前記水性キャリヤー媒体中に不溶性である、前記医薬組成物。
2. 前記ポリマーが約300~100,000の分子量を有する、請求の範囲第1項に記載の組成物。
3. 前記ポリマーが、前記ポリマーのカルボン酸のN-ヒドロキシサクシンイミドエステル又は4-ヒドロキシ-3-ニトロベンゼンスルホネートエステルを介して蛋白質に接合する、請求の範囲第1項又は第2項に記載の組成物。
4. 前記ポリマーが非置換ポリエチレングリコールホモポリマー、モノメチルポリエチレングリコールホモポリマー、又はポリオキシエチル化グリセロールである、請求の範囲第1項~第3項のいずれか1項に記載の組成物。
5. 前記蛋白質がヒト由来の組換蛋白質である請求の範囲第

1項~第6項のいずれか1項に記載の組成物。

6. 前記蛋白質がヒト由来の組換蛋白質である請求の範囲第1項~第5項のいずれか1項に記載の組成物。

7. 前記蛋白質がミューテインである請求の範囲第1項~第6項のいずれか1項に記載の組成物。

8. 前記蛋白質が $\text{ser}(\text{I L-2, des-ala, I L-2, des-ala, ser, I L-2, des-ala, ala, I L-2, des-ala, ala, ser, I L-2, ser, I P N-\beta)$ 、又は組換リシンA鎖とのイムノトキシンである、請求の範囲第1項~第7項のいずれか1項に記載の組成物。

9. 前記蛋白質が蛋白質上の1~10個のリジン残基を介して選択的に接合している、請求の範囲第1項~第8項のいずれか1項に記載の組成物。

10. 医薬組成物の製造方法であって、

(a) 少なくとも一端に反応性基を有する水溶性ポリマーを用意し、ここで該ポリマーはポリエチレングリコールホモポリマー及びポリオキシエチル化ポリオールから成る群から選択されたものであり、該ホモポリマーは置換されていないか又は一端においてアルキル基により置換されており、そして該ポリオールは置換されておらず、

(b) β -インターフェロン、インターロイキン-2 及びイムノトキシンから成る群から選ばれた生物学的に活性であり通常は疎水性であり、水に不溶性である蛋白質を前記ポリマーの反応性基と反応せしめることにより水溶性の生物学的に活性な選択的に接合した蛋白質を得；そして

(c) この蛋白質を非毒性で不活性な、医薬として許容される水性媒体中に配合する；
ことを含んで成る方法。

ポリマー接合を利用する医薬組成物用蛋白質の可溶化

この発明は、生物学的に活性な蛋白質の化学的及び／又は生理学的性質を変化せしめる該蛋白質の化学的修飾に関する。さらに詳しく述べては、この発明は生理的pHにおいて蛋白質を可溶性にするための、ポリマーへの親水性水不溶性蛋白質の選択的接合に関する。

微生物宿主細胞中で生産される多くの異種性蛋白質は疎水性の不溶性物質として見出される。一般に見出される培養条件において疎水性を形成する異種性蛋白質の例にはインターロイキン2 (IL-2)、インターフェロン- β (IFN- β)、ネコ白血病ウイルス (FeLV) 外皮蛋白質、ヒト成長ホルモン(hGH)、ウシ成長ホルモン(bGH)、ブタ成長ホルモン(pGH)、及びFMDウイルスのごときウイルスでコートされ又はこれらの融合した幾つかの蛋白質が含まれる。さらに、これらの蛋白質の多くは疎水性であり、そして溶液のままであるのではなく、物質及びそれ自体に付着しやすい（すなわち、凝集しやすい）。また、これら組換蛋白質の多くはグリコシル化されておらず、これらの天然対応物は水溶性のグリコシル化された分子である。その溶解性を変化せしめるであろうこれらの蛋白質の修飾は、これらの蛋白質の製造収量を上昇せしめ、そしてそれらの療法的使用のための製剤化を容易にするために好ましいであろう。さらに、修飾は、

蛋白質が生体内に導入された場合に蛋白質の凝集を減少せしめ又は除去し、これによってその免疫原性を低下せしめるであろう。

特定の生理的反応を生じさせるための、循環系へのポリペプチドの使用は医学分野において良く知られている。ポリペプチドの臨床的使用に由来する潜在的な療法的利益に対する限界は、循環系において免疫反応を惹起するその能力である。この免疫反応は、R. Illing (1970), *J. Clin. Endocrinol.*, 31, 679-688; W. Moore (1980), *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 46, 20-27; 並びに W. Moore 及び P. Leppert (1980), *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 51, 691-697 により記載されているように、注射に先立つ物質の凝集により惹起されるであろう。この反応は、ポリペプチドが注射された循環系による該ポリペプチドに対する抗体の生産を含む。この抗体生産は、時として循環系での持続時間を短縮する（半減期の短縮）ことにより、又は抗体-ポリペプチド相互作用によって分子を変形せしめることにより、該ポリペプチドの所望の生物学的機能を低下せしめ又は除去するであろう。

これらの潜在的に有用な療法的ポリペプチドを修飾して該ポリペプチドの所望の生理的活性を維持しながら免疫反応を排除し又は少なくとも減少せしめることにより、上記の欠点を伴わないで哺乳類の循環系中に該ポリペプチドを使用することが可能となるであろう。さらに、循環中のポリペプチドの延長された半減期のため、所望の療法的效果のために今まで可能であったよりも少量のポリペプチドが必要とされる

であろう。

前記の免疫原性の問題及び循環中の短い半減期の問題並びに幾つかの蛋白質の他の不希望の性質はよく認識されており、そしてこれらを解決するためにポリペプチドの種々の修飾が行われている。これらには、ポリエチレングリコール (PEG) 又はポリプロピレングリコール (PPG) のごとき實質的に直鎖のポリマーによる蛋白質の修飾が含まれる。例えば、米国特許No 4,261,973 は、免疫原性アレルゲン分子とPEGのごとき非免疫原性水溶性ポリマーとの接合によるアレルゲンの免疫原性的減少を記載している。米国特許No 4,301,144 はPEG, PPG、エチレングリコールとプロピレングリコールとのコポリマー、又はこれらのポリマーのエーテル、エステルもしくは脱水生成物へのヘモグロビンの接合によるヘモグロビン分子の酸素担持能力の増加を記載している。1984年1月11日に公開されたヨーロッパ特許出願公開No 88,110は、ポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレンコポリマーへのポリペプチド又は糖蛋白質の接合がその生理的活性の長さを延長することを記載している。好ましくは、ポリペプチド又は糖蛋白質は水溶性の酵素又は天然インターフェロンである。米国特許No 4,179,337 はPEG又はPPGへの酵素及びインシュリリンのごとき水溶性ポリペプチドの接合により、その生理的活性の実質的部を保持しながらポリペプチドの免疫原性を低下せしめることを示している。米国特許No 4,002,531 はアルデヒド誘導体を介してPEGに酵素を接合せしめる異なる方法を示している。

特表昭62-503171 (3)

米国特許No4,055,635は、ポリサッカライドのごときポリマー基剤に共有結合した蛋白質分解酵素の水溶性複合体を含んで成る医薬組成物を開示している。

米国特許No3,960,830はポリエチレングリコールのごときポリアルキレングリコールポリマーに結合したペプチドを開示している。

米国特許No4,088,538は、ポリエチレングリコールのごとき有機ポリマーに共有結合した酵素を含んで成る可逆的に可溶性で酵素的に活性なポリマー酵素生成物を開示している。

米国特許No4,415,665は、少なくとも1個の第1又は第2アミノ基、少なくとも1個のチオール基及び/又は少なくとも1個の芳香族ヒドロキシ基を含有する有機リガンド（第3カラム、第19～36行目に記載されている）を少なくとも1個のヒドロキシ基を有するポリマー-キャリヤー（第3カラム、第42～66行目に記載されている）に接合せしめる方法を開示している。

米国特許No4,495,285は、カップリング剤を介してポリエチレングリコールにそのアミノ酸側鎖が連結されている非免疫原性プラスミノーゲンアチペーターを開示している。

米国特許No4,412,989は、アミド結合を介してポリエチレン又はポリプロピレングリコールに共有結合しているヘモグロビン又はその誘導体を含有する酵素担持材料を開示している。

米国特許No4,496,689は、 α -1-プロテイナーゼインヒビターとPEG又はメトキシポリエチレングリコールのごと

きポリマーとの共有結合で連結された複合体を開示している。

米国特許No3,619,371は生物学的に活性な物質が化学的に結合しているポリマーマトリクスを開示している。

米国特許No3,788,948は蛋白質をポリマーに結合せしめるための有機シアノート化合物の使用を開示している。

米国特許No3,876,501は臭化シアンにより水溶性炭水化物を活性化して酵素又は他の蛋白質へのその結合を改良することを開示している。

米国特許No4,055,635はポリマー基剤に共有結合した蛋白質分解酵素の医薬組成物を開示している。

EP152,847は酵素接合体、カルシウム塩及びポリエチレングリコールを含んで成る酵素接合体組成物を開示している。

1982年11月26日に公開されたJP 5792435はアミノ基のすべて又は一部分がポリエチレン成分により置換されている修飾されたポリペプチドを開示している。1973年9月27日に公開されたDE 2312615はヒドロキシ又はアミノ基を含有する化合物へのポリマーの接合を開示している。

EP 147,761は α -1-プロテイナーゼインヒビター及び水溶性ポリマー（このポリマーはポリエチレングリコールであることができる）の共有結合接合体を開示している。

米国特許No4,414,147は、インターフェロンをポリ（エチレン無水コハク酸）のごときカルボン酸の無水物に接合せしめることによりその疎水性を少なくすることを記載している。

これらの特許及び特許公表に加えて、幾つかの論文が、酵

素、IgGおよびアルブミンのごとき蛋白質の修飾剤として活性化PEG又はPPGを使用する概念を検討している。例えば、イナダ等、Biochem and Biophys. Res. Comm., 122, 845-850 (1984)は、PEGと接合せしめるためにシアヌル酸クロリドを使用することによってベンゼンのごとき有機溶剤に可溶性であるようにするために水溶性リボプロテインリバーゼを修飾することを開示している。Takahashi等、Biochem. and Biophys. Res. Comm., 121, 261-265 (1984)は、水溶性酵素をベンゼン中で活性で且つ可溶性である様にするためにPEGと共にシアヌル酸クロリドトリアジンを用いてホースラディッシュペーオキシダーゼを修飾することを開示している。Suzuki等、Biochem. Biophys. Acta., 788, 248-255 (1984)は、シアヌル酸クロリドで活性化されたPEGを用いるIgGの凝集の抑制を開示している。Abuchowski等、Cancer Biochem. Biophys., 7, 175-186 (1984)は、サクシンイミジルサクシネットにより活性化されたPEGを用いるE.コリ(E. coli)及びビブリオ・サクシノゲネス(Vibrio succinogenes)からのアスパラギナーゼの修飾が該蛋白質の半減期を延長しそして免疫原性を低下せしめることを述べている。Davis等、Biomedical Polymers (ニューヨーク、アカデミックプレス、1980) p441-451は、通常は不溶性である酵素がPEG付加により可溶化され得ることを開示しているが、これ以上の詳細は記載されていない。幾つかの他の論文は、サクシンイミジルサクシネット又はシアヌル酸クロリドにより活性化されたPEGによる酵素、例えばウリカーゼ、スト

レブトキナーゼ、カタラーゼ、アルギナーゼ及びアスパラギナーゼの修飾により該蛋白質の半減期を延長しそして免疫原性を減少せしめることを検討している。

しかしながら、これらの文献はいずれも、生理的pHにおいて疎水性でありそしてそれ故に水性媒体中での製剤化に抵抗する水溶性組換蛋白質に対してポリマー修飾法をいかに使用するかについての詳細は開示していない。従って、種々の蛋白質の薬理動態及び物理性の大きな差異のため、選択されたどの蛋白質がポリマーによる処理に好都合に反応するかを推定することは先駆的に不可能である。さらに、いずれの文献も蛋白質の凝集、すなわち蛋白質が生体内に導入された場合に免疫反応を惹起する現象を低下せしめ又は排除することを開示していない。

1985年9月11日に公開された武田薬品のEP 154,316は、リンホカインの少なくとも1個のアミノ基に直接結合したPEGを含有する化学的に修飾されたリンホカイン、例えばI-2-2を開示し、そしてクレームしている。

従ってこの発明は、 β -インターフェロン、インターロイキン-2、及びイムノトキシンから選択される、周囲条件下で医薬として許容されるpH範囲において水中に通常不溶性である蛋白質を修飾してこれらをこの様な条件下で水性緩衝液中に溶解するようになるとを提供する。この修飾は蛋白質のグリコシル化を模倣し、これによって天然のグリコシル化蛋白質が可溶性であると同様に蛋白質を驚くほど可溶性にする。この修飾はまた、蛋白質を溶液状に維持するために洗

又は変性剤のごとき外来性可溶化添加剤の添加を回避する。修飾された蛋白質は、最初及び時間の経過後のいずれにおいても修飾されていない蛋白質の生物学的活性を保持する。

第2の利点として、ある条件下での修飾は、蛋白質の凝聚を減少せしめもししくは排除することにより又は抗原決定基をマスクすることによって、蛋白質の生理的半減期を延長し、そしてその免疫原性を低下せしめるであろう。インビボ半減期は適切な条件及びポリマーを選択することにより調節することができる。

さらに詳しくは、この発明は、 β -インターフェロン、インターロイキン-2及びイムノトキシンから成る群から選択された生物学的に活性な選択的に接合した蛋白質が溶解している、非毒性で不活性な医薬として許容される水性キャリヤー媒体を含んで成る医薬組成物に関し、この医薬組成物においては前記蛋白質がポリエチレンジリコールホモポリマー及びポリオキシエチル化ポリオールから成る群から選択された水溶性ポリマーに共有結合しており、ここで前記ホモポリマーは置換されていないか又は一端においてアルキル基により置換されており、そして前記ポリオールは置換されておらず、そして前記蛋白質はその未接合形においては通常は疎水性でありそして可溶化剤の非存在下pH 6~8においては前記水性キャリヤー媒体に溶解しない。

好ましくは、前記ポリマーは非置換ポリエチレンジリコール(PEG)、モノメチルPEG(α PEG)又はポリオキシエチル化グリセロール(POG)であり、そしてこのものは、

第2図は、2つの異なるpHにおける未修飾IL-2に比較したPEG化IL-2の溶解性を200~650nmの吸光スキャンにより示す。

第3図は、マウスに静脈内注射した後のPEG化IL-2及び未修飾IL-2の薬理動態(pharmacokinetics)を示す。

第4図はマウスに皮下注射した後のPEG化IL-2及び未修飾IL-2の薬理動態を示す。

第5図はIFN- β モル当りPEG⁰、10、20及び50モルにおける反応から得られたPEG化IFN- β の分子量分析のための14%非還元SDS-ポリアクリラミドゲルのデンシトメーター測定スキャンを示す。

第6図は2つの異なるpHにおける未修飾IFN- β と比較したPEG化IFN- β の溶解性を200~650nmの吸光スキャンにより示す。

この明細書において使用する場合、蛋白質を記載する“通常疎水性で水不溶性”なる語は、約6~8のpHすなわちおよそ中性の又は生理的pHにおける室温及び大気圧の周囲条件下で又は水性媒体に不溶であるか又は難溶である蛋白質に関する。

この明細書において、修飾はそのような蛋白質がそのような生理的条件にかけられた場合にそれらの溶解性を増加せしめる様に作用する。この発明の目的のため、溶解度は(1)分光光度法により測定される濃度、(2)超遠心分離(ここでは、非常に大きな凝集体の沈降速度ではなくモノマー蛋白質の沈降速度が溶解度を示す)により測定されるS値、及び

PEG、 α PEG又はPOGカルボン酸の4-ヒドロキシ-3-ニトロベンゼンスルホン酸エステル又はN-ヒドロキシサクシシンイミドエステルから形成されるアミド結合を介して前記蛋白質にカップリングする。

この発明の他の観点は医薬組成物の製造方法に関し、この方法は：

(a) 少なくとも1個の末端反応性基を有する水溶性ポリマーを用意し、ここでこのポリマーはポリエチレンジリコールホモポリマー及びポリオキシエチル化ポリオールから成る群から選択されたものであり、ここで該ホモポリマーは置換されていないか又は一端においてアルキル基により置換されており、そして該ポリオールは置換されておらず；

(b) β -インターフェロン、インターロイキン-2及びイムノトキシンから成る群から選択された生物学的に活性で通常疎水性であり水不溶性である蛋白質を前記ポリマーの反応性基と反応せしめることにより水溶性であり生物学的に活性である選択的に接合した蛋白質を得；そして

(c) この蛋白質を非毒性であり不活性な医薬として許容される水性キャリヤー媒体中に配合する；ことを含んで成る。

第1図は、1L-2モル当り活性化されたPEG(PEG⁰)0、10、20、50及び100モルにおける反応から得られたEPG-修飾(PEG化)IL-2の分子量分析のための14%SDS-ポリアクリラミドゲルのデンシトメーター分析スキャンを示す。

(3) サイズ排除クロマトグラフィーにより測定される見かけの自然分子量(この場合、不溶性蛋白質よりも可溶性蛋白質がこの値に近い)により試験することができる。これらの試験のそれぞれについて、溶解度を示すであろう正確な数値は蛋白質がその中に配合される緩衝液のタイプ、該緩衝液のpH、及び該緩衝液のイオン強度に依存するであろう。

この発明においてインターフェロン α 及びインターロイキン-2は組培養から又は組換技法により、そして任意の哺乳類、例えばマウス、ラット、ラビット、蟹長蝶、ブタ、及びヒトから得ることができる。IFN- β 、好ましくはヒトIFN- β について命名される“組換 β -インターフェロン”なる語は、天然IFN- β に匹敵する生物学的活性を有する、従来技術において記載されている組換DNA技法により調製される線維芽細胞インターフェロンに関する。一般に、インターフェロンをコードする遺伝子はその天然プラスミドから切り出され、そしてクローニングするためのクローニングベクターに挿入され、そして次に発現ベクターに挿入され、これは宿主生物、好ましくは微生物、そして最も好ましくはE. coliを形質転換するために用いられる。この宿主生物はある条件下でインターフェロン遺伝子を発現せしめることによりIFN- β を生産する。さらに好ましくは、IFN- β は米国特許No.4,588,585に記載されているようなミューテイン(mutant)であり、このミューテインにおいては野生型又は天然分子の17位に通常存在するシステインがセリン又はアラニンのごとき中性アミノ酸により置き換えられている。最

も好ましくは、IFN- β ミューテインはIFN- β ser17である。

IL-2、好ましくはヒトIL-2について命名される“組換インターロイキン-2”なる語は、天然IL-2に匹敵する生物学的活性を有し、例えばタニグチ等、*Nature*, 302: 305-310(1983)及びDeves, *Nucleic Acids Research*, 11: 4307-4323(1983)により記載されている組換DNA技術により調製されるインターロイキン-2に関する。一般に、IL-2をコードする遺伝子はその天然プラスミドから切り出され、そしてクローン化するためのクローニングベクターに挿入され、そして次に発現ベクターに挿入され、このものは宿主生物、好ましくは微生物、そして特に好ましくはE.コリを形質転換するために使用される。この宿主は発現条件下で外来遺伝子を発現せしめることによりIL-2を生産する。

さらに好ましくは、IL-2は米国特許No.4,518,584に記載されている様なミューテインであり、このミューテインにおいては野生型又は天然分子の125位に通常存在するシステインがセリン又はアラニンのごとき中性アミノ酸により置き換えられている。これに代って又はこれと組合せて、IL-2ミューテインは野生型又は天然分子の104位に通常存在するメチオニンがアラニンのごとき中性アミノ酸により置き換えられているものである。

好ましくは、IL-2は、天然ヒトIL-2のアミノ酸配列のジスルフィド結合を天然ヒトIL-2のアミノ酸配列に少なくとも実質的に同一のアミノ酸配列を有しそして天然ヒ

トIL-2と共に生物学的活性を有する蛋白質をコードするIL-2のヒトcDNA配列により形質転換された微生物又は酵母により生産される蛋白質である。アミノ酸配列の実質的同一とは、同一であるか又は合成蛋白質と天然ヒトIL-2との間の不適合な機能的相違を惹起しない1個又はそれより多くのアミノ酸の変更(除去、付加、置換)により異なる配列を意味する。この様な性質を有するIL-2蛋白質の例にはタニグチ等、前掲; Deves、前掲; ヨーロッパ出願公開No.91,539及びNo.88,195; 米国特許No.4,518,584、前掲に記載されているものが含まれる。最も好ましくはIL-2はser17: IL-2、des-alanine:ser17: IL-2、des-alanine: IL-2、des-alanine: IL-2、又はdes-alanine:des-alanine: IL-2であり、ここで“des-alanine”はIL-2のN-末端アラニン残基が除去されていることを示す。

本発明の蛋白質の正確な化学構造は多数の因子に依存するであろう。分子中にイオン化可能なアミノ基及びカルボキシル基が存在すれば、特定の蛋白質は酸性塩もしくは塩基性塩として又は中性の形で得られるであろう。適切な環境条件下に置かれた場合にこれらの生物活性を保持しているこれらすべての調製物は本発明の蛋白質の定義に含まれる。さらに、蛋白質の一次アミノ酸配列は糖成分を用いる誘導体化(グリコシル化)により、又は他の補完的分子、例えばリビド、リン酸基、アセチル基等により、そしてより一般的にサッカライドとの接合により付加され得る。この様な付加の幾つかの鍵点は生産宿主の翻訳後プロセシング系を介して達成され、

他のこの様な変形はインピトロで誘導されるであろう。ともかく、この様な変形は、蛋白質の生物活性が破壊されない限り本発明の定義に含まれる。言うまでもなく、この様な変形は、種々のアッセイにおいて蛋白質の活性を増強し又は低下せしめることにより量的又は質的に生物活性に影響を与えることができる。

しばしば、組換DNAを含有する形質転換された宿主細胞から生産されたIL-2及びIFN- β のごとき疏水性組換蛋白質は、細胞培養培地中に溶解するのではなく、細胞内に沈澱する。細胞内に生産された蛋白質は、精製された生物学的に活性な材料に調製される前に、細胞破片から分離されそして細胞から回収されなければならない。この様な粗筋体を単離するための方法においては、形質転換された宿主微生物の細胞膜が破壊され、この破砕物から99重量%以上の塩が除去され、脱塩された破砕物が再砕碎され、この破砕物に物質、例えば糖、例えばショーカロースが添加され、破砕物内の液中に密度又は粘度の勾配が形成され、そして高速遠心分離すなわち約10,000~40,000 $\times g$ により粗筋体が細胞破片から分離される。好ましくは、ダイアフィルトレーション又は遠心分離により破砕物から塩が除去され、そして液の密度を約1.1~1.3 g/ cm^3 に上昇せしめるためにショーカロースが添加される。

遠心分離段階の後、粗筋体を含有するペレットを変性剤、例えばドデシル硫酸ナトリウムにより可溶化し、生成した懸濁液を遠心し、そして蛋白質を含有する上清を処理して蛋白

質を単離する。蛋白質は適切な手段、例えば逆相高圧液体クロマトグラフィー(RP-HPLC) 及び/又はゲル滲過クロマトグラフィーにより上清から分離される。この様な分離の後、好ましくは蛋白質を酸化して、その天然対応物に最も類似する配列にある組換蛋白質の高収量の生産を保証する。この様な酸化はZ. Shaked等の米国特許No.4,530,787に記載されている。酸化はまた、K. Kotha等の米国特許No.4,572,798に記載されている様に、可溶化された形の蛋白質を含有する水溶液を約5.5~9のpHにおいて、空気の存在下で、 Cu^{++} 陽イオンを含有する少なくとも有効量の酸化促進剤と反応せしめることにより行うことができる。好ましい酸化促進剤又は酸化剤は CuCl_2 又は(0-フェナントロリン): Cu^{++} である。酸化の後、蛋白質を場合によっては脱塩し、そしてRP-HPLC、稀釈/ダイアフィルトレーション、S-200 ゲル滲過クロマトグラフィー、及び紫外滲過技術によりさらに脱塩及び精製した後に、後に記載する様に活性化ポリマーにより修飾する。この修飾を行う時点は最終医薬剤及び用途のために要求される蛋白質の最終純度に依存するであろう。

この明細書において蛋白質の第3のクラスに適用するため使用する場合、“イムノトキシン”なる語は、抗体と細胞変性成分との接合体に関する。イムノトキシンの細胞変性成分は細胞変性剤、細菌又は植物由来の酵素的に活性な毒素、あるいはこの様な毒素の酵素的に活性な断片(“A種”)を包含する。酵素的に活性な毒素及びその断片の例にはジフテリアA種、ジフテリア毒素の非結合断片、エキソトキシンA

根 (シードモナス・アエルギノーラ (*Pseudopanax nerua*-*neus*) から) 、リシン A 領、アブリン (abrin) A 領、モデッシン (*nodeccin*) A 領、 α -サルシン、アロイリテス・ホルディー (*Aleurititia fordii*) 蛋白質、ジアンチン (*dianthrin*) 蛋白質、フィトラッカ・アメリカーナ (*Phytolacca americana*) 蛋白質 (PAP I、PAP II、及び PAP-S) モナルディカ・カランチア (*concordia charantia*) インヒビーター、クルシン (*cucurbita*)、クロチン (*crotin*)、サボナリア・オフィシナリス (*saponaria officinalis*) インヒビーター、ゲロニン (*gellonia*)、ミトゲリン (*mitogellin*)、レストリクトシン (*restrictocin*)、フェノマイシン (*phenosycin*)、及びエノマイシン (*enomycin*) が含まれる。リシン A 領、ジフェリア毒素の非活性断片、アブリン A 領、及び PAP II が好ましい。ポリマーとの反応により修飾されるリシン A 領が最も好ましい。

イムノトキシンにおいて使用される抗体は好ましくは、特定の疾患状態、例えば癌、例えば乳癌、前立腺癌、直腸癌又は卵巣癌、黑色腫、骨肉腫等に対して向けられたモノクローナル抗体である。

抗体と細胞毒性成分との接合体は以下の 2 官能性蛋白質修飾剤を用いて行うことができる。この様な試薬の例には N-サクシンイミジル -3- (2-ビリジルジオ) プロピオネート (SPDP)、イミノチオレート (IT)、イミドエステルの 2 官能誘導体、例えばジメチルアジビミデート・BCM、活性エステル、例えばジサクシンイミジルスペレート、アルデ

ヒド、例えばグルタルアルデヒド、ビス・アジド化合物、例えばビス (p-アジドベンゾイル) ヘキサンジアミン、ビス-ジアジニウム誘導体、例えばビス- (p-ジアジニウム-ベンゾイル) -エチレンジアミン、ジイソシアネート、例えばトリレン -2, 6-ジイソシアネート、及びビス-活性第 2 族化合物、例えば 1, 5-ジフルオロー-2, 4-ジニトロベンゼンが含まれる。

この明細書において蛋白質に適用するために使用する場合、"選択的に接合した" なる語は、主として反応条件、最終用途、ポリマーの分子量、及び使用される特定の蛋白質に依存して、蛋白質の 1 個又は複数個のアミノ酸残基を介して共有結合した蛋白質に関する。この残基は蛋白質上の任意の反応性アミノ酸、例えば 1 個もしくは 2 個のシステイン又は N-末端アミノ酸基であることができるが、好ましくは反応性アミノ酸はリジンであってその遊離 α -アミノ基を介して活性化されたポリマーの反応性基に接合され、又はグルタミン酸もしくはアスパラギン酸であってアミド結合を介してポリマーに接合される。

蛋白質の 1 つの好ましい態様においては、蛋白質の 1 個又は 2 個のアミノ酸残基、好ましくは最大生物活性のためリジンを介して共有結合される。他の好ましい態様においては、蛋白質は、蛋白質の循環寿命を一般に増加せしめる高度な置換を伴って、蛋白質の 10 個までのアミノ酸残基、好ましくはリジンを介して共有結合される。

この発明の方法に従えば、通常は疏水性でありそして水不

溶性である上記の 3 つのタイプの蛋白質は、可溶化剤を使用することなく、特定のポリマーへの接合により蛋白質を修飾することにより、好ましくは約 5~8、さらに好ましくは約 6~8、そして最も好ましくは 6.5~7.8 の pH において水性キャリヤー媒液中に可溶化される。蛋白質がそのリジン残基を介して反応する場合、反応の pH は好ましくは約 7~9、さらに好ましくは 8~9 である。これらの蛋白質のこの様な修飾の成功は、従来の水溶性酵素及びホルモンのポリマー修飾の使用から予想することができない。

蛋白質が付加されるポリマーはポリエチレングリコール (PEG) のホモポリマー又はポリオキシエチル化ポリオールであり、すべての場合においてポリマーが室温において水溶性であることが条件となる。ポリオキシエチル化ポリオールの例には、例えば、ポリオキシエチル化グリセロール、ポリオキシエチル化ソルビトール、ポリオキシエチル化グルコース等が含まれる。

ポリオキシエチル化グリセロールのグリセロール骨格は、例えば動物及びヒトにおいてモノ-、ジ-トリーグリセライドとして天然に存在するのと同じ骨格である。従って、この分歧は体内における外來物質として必然的に見られることはないであろう。

ポリマーはある特定の分子量を有することを必要としないが、しかし、例えば使用される特定の蛋白質に依存して、分子量が約 300~100,000、さらに好ましくは 350~40,000 の範囲であることが好ましい。

好ましくは、PEG ホモポリマーは置換されていないが、しかしそれは一端においてアルキル基により置換されていてもよい。好ましくは、このアルキル基は C₁ ~ C₆ アルキル基、そして最も好ましくはメチル基である。最も好ましくは、ポリマーは PEG の非置換ホモポリマー、PEG のモノメチル置換ホモポリマー、又はポリオキシエチル化グリセロールであり、約 350~40,000 の分子量を有する。

蛋白質はポリマー上の未端活性基を介して接合される。活性基を有するポリマーを、この明細書において活性化されたポリマー (又は活性化ポリマー) と称する。活性基は蛋白質上の遊離アミノ基又は他の反応性基と反応する。しかしながら、最適の結果を得るために選択される反応性基のタイプ及び且並びに使用されるポリマーのタイプは、該反応性基が蛋白質上の多過量の特に活性な基と反応するのを回避するために、使用される蛋白質に依存するであろう。これを完全に回避することが不可能な場合、蛋白質の濃度に依存して蛋白質モル当たり一般に約 0.1~1000 モル、好ましくは 2~200 モルの活性化されたポリマーを使用することが推奨される。特に 1 L-2 の場合、使用される活性化されたポリマーの量は 1 L-2 のモル当たり 50 モル以下であり、そして最も好ましくは、最終的に所望される特定の性質に依存して 1 L-2 のモル当たり約 2~20 モルである。すなわち、最終量は、最適活性を維持し、同時に可能であれば蛋白質の半減期を最適化する均衡である。好ましくは、蛋白質の生物活性の約 50% が維持され、そして最も好ましくは 100% が維持される。

共有結合修飾反応は、不活性ポリマーを用いて反応性の生物学的に活性な材料のために一般に使用される任意の適当な方法により、蛋白質上の反応性基がリジン基である場合には好ましくは約pH 5～9において、行うことができる。一般に、この方法は、活性化されたポリマー（少なくとも1個の末端ヒドロキシ基を有する）を調製し、そしてその後で蛋白質を活性化されたポリマーと反応せしめることにより配合に適する可溶化された蛋白質を生成せしめることを含む。

上記の修飾反応は、1又は複数の段階を含む幾つかの方法により行うことができる。一段階反応において活性化されたポリマーを生成せしめるために使用することができる適切な修飾剤の例にはシアヌル酸クロリド（2, 4, 6-トリクロロ-S-トリアジン）及びシアヌル酸フルオリドが含まれる。

好ましい態様において、修飾反応は2段階において行われ、この場合まずポリマーを酸無水物、例えば無水コハク酸、又は無水グルタル酸と反応せしめることによりカルボン酸を形成せしめ、そして次にこのカルボン酸を他のカルボン酸と反応することができる化合物と反応せしめることにより蛋白質と反応することができる反応性エステル基を有する活性化されたポリマーを形成せしめる。この様な化合物の例にはN-ヒドロキシサクシンイミド、4-ヒドロキシ-3-ニトロベンゼンスルホン酸等が含まれ、そして好ましくはN-ヒドロキシサクシンイミド又は4-ヒドロキシ-3-ニトロベンゼンスルホン酸が使用される。例えば、モノメチル置換されたPEGは上昇した温度、好ましくは約100～110℃にて4時

間、無水グルタル酸と反応せしめることができる。次に、こうして生成したモノメチルPEG-グルタル酸を、カルボジイミド試薬、例えばジシクロヘキシルカルボジイミド又はイソプロピルカルボジイミドの存在下でN-ヒドロキシサクシンイミドと反応せしめることにより活性化されたポリマー、メトキシポリエチレン-グリコリル-N-サクシンイミジルグルタレートを生成せしめる。これは次に蛋白質と反応することができる。この方法は、Abuchowski等、Cancer Biochem. Biophys., 1, 175～186(1984)に詳細に記載されている。他の例において、モノメチル置換されたPEGを無水グルタル酸と反応せしめ、次にジシクロヘキシルカルボジイミドの存在下で4-ヒドロキシ-3-ニトロベンゼンスルホン酸(BNSA)と反応せしめることにより活性化されたポリマーを生成せしめることができる。BNSAは、Bhatnagar等、Peptides: Synthesis-Structure-Function, Proceedings of the Seventh American Peptide Symposium, Rich等(編集)(ビースケミカル社、ロックホールドIL、1981) 97～100頁、並びにHiteck等、High-Technology Route to Virus Vaccines (米国微生物学会: 1986) "Novel Agent for Coupling Synthetic Peptides to Carriers and Its Application."に開示されている。

エステル結合はアミド結合に比べて化学的及び生理的に安定でないため、エステルの同時的生成を伴わないでカルボン酸又はアミドを生成する接合反応中化学的置換を用いるのが好ましいであろう。

却、ナチュラルキラー細胞活性の増強、IFN- γ の説明、細胞免疫の回復又は増強（例えば、免疫不全症の治療）、及び細胞免疫活性の増強のために適当である。

IL-2の直接投与に代えて、IL-2は用いられる免疫療法において、臓器されリンパ球活性化されたリジンバ球と一緒に、医薬として許容されるキャリヤー中に投与することができる、この場合リンパ球は腫瘍を有するヒトにIL-2と共に投与された場合腫瘍と反応する。この方法は、S.Rosenberg等、New England Journal of Medicine (1985), 313: 1485～1492により十分に記載されている。

IFN- β 療法は抗癌、抗ウイルス及び抗乾癐治療のために適当である。IFN- β なんらかの効果を示す特定の癌にはリンパ腫、骨髄腫、ヘアリ-細胞白血病、並びに性病及びライノウイルスを含む数つかのウイルス性疾患が含まれる。

イムノトキシン療法は、それに対する標的の抗体が有効である疾患、通常は癌に対して適当である。特に、イムノトキシンは乳癌のごとき癌に向けられる。

イムノトキシンの投与量及び使用方法は、例えば薬剤の療理効能、癌の種類及びその範囲、ポリマーのタイプ及び量、特定のイムノトキシンの性質、例えばその製法係酸、患者、並びに患者の病歴に依存するであろう。IL-2及びIFN- β の投与量及び使用方法は同様に例えば薬剤の療理効能、癌の種類、IL-2又はIFN- β の性質、患者、及び患者の病歴に依存するであろう。例えば、異なる修飾されたIL-2蛋白質は、異なる投与経路のために有利な異なる療理効能的

こうして修飾された蛋白質は次に非活性の不活性な医薬として許容される水性キャリヤー媒体中に、好ましくは約3～8、さらに好ましくは6～8のpHにおいて配合する。インピトロでの適用のため、例えば診断目的で使用されるイムノトキシンのため、適用及び製剤化の態様は臨界的ではない。培養又はかん流媒体と相溶性の水性製剤が一般に使用されるであろう。療法のためにインピトロで使用される場合、無菌生成物は、混合物が再溶解された場合に医薬として許容されるpHをもたらす以下の水性製剤液中に溶解した蛋白質混合物から成るであろう。この媒体には場合によってはマンニトールのごとき水溶性キャリヤーが添加されるであろう。現在製剤化されている未修飾IL-2は4℃において少なくとも6ヶ月間安定である。

医薬中の蛋白質の項目レベルは前臨床試験において得られるインピトロ効力データーに依存し、そして主として使用される蛋白質及び最終用途に依存するであろう。

医薬を凍結乾燥する場合、この凍結乾燥混合物は、バイアル中に常用の非経口水性注射剤、例えば霧化水を注入することにより再溶解せしめることができる。

上記の様にして調製された再溶解された医薬は、ヒト又は他の動物に、これらに治療をもたらすのに療法的に効果的な量（すなわち患者の疾患状態を除去し又は緩和せしめる量）において非経口投与するために適当であり、療法のタイプは蛋白質のタイプに依存する。例えば、IL-2医薬は日々の免疫調節症状、例えばT細胞変異説明、細胞変性T細胞の説

及び収率的性質を有すると予想される。長期に作用する薬剤は3~4日ごと、1週間~2週間に1回投与すれば足りるであろう。クリアランス速度は、例えば付加するポリマーのタイプ及びポリマーのサイズを変えることによって、患者の特定の要求に合致するように最終的収率性を与えることによって変更することができる。

この発明をさらに説明する次の例において、特にことわらない限りすべての部及び図は丘氏により、すべての温度は℃により示す。

例 I

PEG化されたインクーフェロン-2 (IL-2) の調製 A. PEG-エステルの調製

商業的に入手可能なモノメチルPEG-5000をまず100℃~110℃にて4時間にわたりグルタルアルデヒドと反応せしめることにより、又はAbuchowski等、*Cancer Biochem. Biophys.*, 7, 175~186(1984)の方法と同様の方法により、分子量5000のPEGの線状のモノメチル置換されたエステルを得ることができる。生ずるPEG-グルタレートを、Abuchowski等、前掲、176頁に詳細に記載されている様にして、ジシクロヘキシカルボジイミドの存在下でN-ヒドロキシサクシンイミドと反応せしめる。生ずる生成物はメトキシポリエチレングリコールN-サクシンイミジルグルタレートであり、以後PEG*と称する。

同様にして、無水コハク酸をモノメチルPEG-5000と反応せしめ、そして生ずるPEG-サクシネートをN-ヒドロ

キシサクシンイミドと反応せしめた。生ずる生成物はメトキシポリエチレングリコールN-サクシンイミジルサクシネートである。

他の段階において、そして類似の方法により、N-ヒドロキシサクシンイミドの代りにHNSAを使用してPEGカルボン酸エステル-HNSAを調製した。このエステルの調製はBhatnagar等、前掲、及びNitecki等、前掲に記載されている。PEGカルボン酸エステル-HNSAはこの例及び後続の例に記載する方法において活性化されたPEGとして使用することができる。

B. IL-2へのPEG*の接合

この例のため、米国特許No.4,518,584及び4,530,787(前掲)に記載されている様にして調製された、RP-RPLC精製された粗製des-alanyl, series IL-2(125位のシスティンがセリンにより置換されている)、又は前記の製造方法からのダイアフィルトレーション後のdes-ala, series IL-2を用いた。1mgの緩衝液(磷酸ナトリウム、pH9; 0.1% SDS)中0.5mgのこの粗製されたIL-2に、IL-2モル当たり0, 2.5, 5, 10, 20, 50及び100モルのPEG*のモル比で、新しく調製した水性PEG*を添加した。十分に混合した後、この溶液を室温(23℃)にて30分間攪拌した。各反応混合物をセファデックスG-25カラム(ファルマシア)に適用して低分子量粗からIL-2及びPEG-IL-2を分離した。セファデックスG-25カラムはSDSを含有しない10mL

磷酸ナトリウム(pH9)中で使用し、そして蛋白質からSDSのほとんどを除去するためにも役立てた。ほとんどの未修飾のIL-2及びSDSは、混合床イオン阻止樹脂(ビオーラDAG11A8)に反応混合物を添加することによっても除去した。PEG化IL-2サンプル中の残留SDSのレベルは、B.Sokoloff及びB.Frigon, *Anal. Biochem.*, 118, 138~141(1981)により記載されたアクリジン-オレンジ試験により測定した場合、蛋白質当たり3~7%のSDSであった。

C. 修飾されたIL-2の精製

疏水性交換クロマトグラフィー(ビオーラド:バイオゲル-フェニル-5-PH)を用いて、精製されたPEG化IL-2を得た。減少する度を用いる直線状グラジェント(溶剤Aは5.0mMリン酸ナトリウム(pH7)中1.7M(NH4)2SO4である; 15分間で100~0%のA)は、PEG化IL-2と未修飾IL-2の良好な分離をもたらした。溶剤Bへの10%エタノールの添加、及び冰浴中のカラムの保持がそれぞれ、PEG化IL-2の回収及び分離を順序に均強した。回分のアリコートを、Gillis,S.等、*J. Immunol.*, 120, 2027~2032(1978)に一般に記載されている方法により、IL-2の生物活性(細胞増殖)についてアッセイした。

例 II

PEG化IL-2の特徴付け

A. 各々のPEG*対IL-2のモル比を用いる反応からの修飾されたIL-2生成物のサイズの特徴付け

IL-2モル当たり0, 10, 20, 50又は100モルのPEG*

を含む、例I, A. に記載した反応からの生成物のSDS-PAGE(14%)は、PEG*とIL-2のモル比の増加と共に修飾の程度が増加することを示した。第1図に示す様に、島津2波長スキャナを用いて、粗々のゲルレーンのデンシトメータースキャンを得た。10PEG*/IL-2サンプル、及び20PEG*/IL-2サンプルは、少々の未修飾IL-2のほかに約2.5kdの見かけ分子量を有する明瞭な1筋を示した。50PEG*/IL-2及び100PEG*/IL-2においては、高分子量領域に、密度にPEG化された蛋白質に特徴的な汚れ(shear)が存在し、そして未修飾IL-2は存在しなかった。

TSK-250カラム(ビオーラド:25×0.4cm、PBS中)上でのPEG-IL-2溶液のサイズ排除は、PEG*対IL-2の比率の増加に伴い修飾が均強するという他の証明を与えた。

B. 修飾の程度の閾値としてのPEG化IL-2の生物活性

IL-2のモル当たり0, 2.5, 5, 10, 20, 50及び100モルのPEG*を含有するIL-2PEG化反応の前記のビオゲル-フェニルカラムからの回分を、例I, C. に記載したIL-2細胞増殖バイオアッセイによりアッセイした。結果を第1表に增加的に示す。より多くのアミノ基が修飾されるに従って、IL-2の不活性化は徐々に増加した。100PEG*/IL-2のモル比で行われた反応において、修飾されたIL-2生成物の比活性は未修飾IL-2のそれの約10%に有意に低下した。

特表昭62-503171(9)

第 1 表
修飾の程度の関数としての PEG 化 IL-2 の生物活性

IL-2 のモル当たり最初に加えられた PEG-エステルのモル	生物活性 (BRM P 標準ユニット/IL-2)*
1. 0 PEG* / IL-2	7.36 ± 4.83 × 10 ⁴
2. 2.5 PEG* / IL-2	9.20 ± 3.45 × 10 ⁴
3. 5 PEG* / IL-2	11.50 ± 2.30 × 10 ⁴
4. 10 PEG* / IL-2	10.35 ± 4.37 × 10 ⁴
5. 20 PEG* / IL-2	7.82 ± 2.76 × 10 ⁴
6. 50 PEG* / IL-2	3.45 ± 2.30 × 10 ⁴
7. 100 PEG* / IL-2	0.69 ± 0.23 × 10 ⁴

*これらの数値は IL-2 バイオアッセイにおける大きな変動を反映している。

C. 未修飾 IL-2 と比較した PEG 化 IL-2 の溶解度

修飾反応、及びこれに続く SDS の除去をもたらすセファデックス G-25 クロマトグラフィーの後、PEG 化 IL-2 の pH を 6.5 ～ 7 に低下せしめた。低 SDS 中での未修飾 IL-2 は pH 5 ～ 7 において比較した。第 1 表中の PEG* / IL-2 の量について低分子比において行われた反応からの修飾された IL-2 は、AG11AB 出版又はビオグルーフェニル (BPLC) クロマトグラフィーによりその後除去され得る未修飾の IL-2 のために、いくらかの割りを有していた。PEG* / IL-2 の高分子比からの修飾された IL-2 の溶液は長時間透明なままであった。pH 調整された溶液を超速心分

離 (50,000 rpm, SW60 ローター、5 分で 12 時間) した。上清を取り出し、そして貯蔵した。SDS-PAGE による強度及び上清の両者のアリコートの分析は、残渣が未修飾 IL-2 であり、他方上清が PEG 化 IL-2 を含有することを示した。SDS 又は他の変性剤の不存在下中性 pH の水性媒体中の PEG 化 IL-2 及び未修飾 IL-2 の溶解度の動的な差は第 2 図の吸光スキャン (Hewlett-Packard 8450A スペクトロフォトメーター) により示される。特徴的スペクトルの喪失により示される様に、未修飾 IL-2 は pH 7 において溶解から沈殿する。

精製された PEG 化 IL-2 (BPLC-フェニルカラムの後) は、洗剤又は変性剤を含まない水性緩衝液中に pH 7 において完全に可溶性であった。精製された PEG 化 IL-2 は、試験された期間 (少なくとも 5 ヶ月間) にわたり溶解のままであり、そしてその生物活性を維持した。SDS を伴わない中性 pH において可溶性であった PEG 化 IL-2 は、0.1% の SDS の存在下での未修飾の IL-2 に比較して次の比活性を有していた。

IL-2 のモル当たり最初に添加した PEG* のモル	比活性 (BRM P 標準ユニット/IL-2)*
0	7.36 × 10 ⁴
1.0	12.88 × 10 ⁴
2.0	8.51 × 10 ⁴

10 PEG* / IL-2 及び 20 PEG* / IL-2 の NK 活

性 (ナチュラルキラー活性: 米国特許 No. 4,518,584 に記載されている)、及び LAK 活性 (リンホカイン-活性化キラー活性: Grimm 等、*J. Exp. Med.*, 155, 1823-41 (1982) に記載されている) は未修飾 IL-2 のそれらと同一であった。未修飾 IL-2 に対して 20 倍過剰の遊離 PEG (4 K ダルトン) の添加は NK 又は LAK 活性に影響を与えたなかった。

D. pH の関数としての PEG 化 IL-2 の安定性

IL-2 のモル当たり 50 モルの PEG* を用いる修飾反応からの PEG 化 IL-2 を、種々の pH で、室温にて 3 時間インキュベートし、そして次に 14% SDS-PAGE により IL-2 ポリペプチドからのアミド結合 PEG の加水分解について測定した。PEG 化 IL-2 を、0.1% のトリフルオロ酢酸を含有する 10% アセトニトリル (pH 2.5) 中に 3 倍に稀釈し、そしてさらに pH 7.5, 1.0, 及び 1.1 にてインキュベートした。アルカリ性 pH は pH 9 の弱酸緩衝液に NaOH を添加することにより達成された。これらの条件下で pH 1 より低い pH において加水分解の証拠は得られなかった。しかしながら、pH 1 において PEG 化 IL-2 は加水分解に感受性であった。室温 (20 ～ 23°C) にて 3 時間にわたり PEG 化 IL-2 が安定であるという観察は、類似の条件下で行われる RP-BPLC 段階を含む IL-2 回収方法を記載する、1986 年 2 月 11 日に与えられた米国特許 No. 4,569,790 の観点から特に有用である。

E. マウスにおいて未修飾 IL-2 と比較した PEG 化 IL-2 の薬理動態

1. 静脈内投与

未修飾 IL-2 及び PEG 化 IL-2 の 2 種類の調製物の薬理動態データを、合計 36 匹のマウスにおいて各マウスに DSW (水中 5% デキストロース) 中 12.5 μg の蛋白質の静脈内投与の後に得た。注射のために使用したサンプル (100 μl ポルス) は下に示す通りであり、そして下記の活性を有していた。

サンプル	IL-2 活性 (BRM P 標準ユニット/IL-2)*
A. 未修飾 IL-2 (ロット LP-263)	5.98 ± 0.46 × 10 ⁴
B. PEG 化 IL-2 (10 モル PEG* / 1 モル IL-2 の反応から)	12.19 ± 4.14 × 10 ⁴
C. PEG 化 IL-2 (50 モル PEG* / 1 モル IL-2 の反応から)	4.37 ± 0.29 × 10 ⁴

サンプル A は、最終濃度 0.1% の SDS を含有する DSW 中での注射により材料が凝集しない様にされた。PEG 化 IL-2 サンプル (B 及び C) には SDS を含めなかった。これらは通常の水性条件下で凝集することなく完全に溶解したからである。

12 匹の雌性 Balb/C マウスの 3 群の各マウスに、3 種類のサンプルの 1 つを尾部静脈に注射し、そして 1.5 分間目にすべての動物から眼窩後から採血した。注射の後種々の時間に 100 μl の血液サンプルを眼窩後からヘパリン処理した毛細

特表昭62-503171 (10)

サンプル	IL-2生物活性の回収(%)
A. 未修飾IL-2	57
B. PEG修飾IL-2 (10PEG* / IL-2)	72
C. PEG修飾IL-2 (50PEG* / IL-2)	100

管に取り出した。遠心分離(1分間)によりすぐに血漿を調製し、そしてアリコートを例I. C. に記載したバイオアッセイのためのアッセイ媒体中に稀釈した。第3図は未変性IL-2及びPEG化IL-2サンプルの2つの粗製物の凝乳助凝を示す。第3図からの、IL-2の最初の分布の半減期(50%生物活性)は次の通りである。

サンプル	t 1/2
A. 未修飾IL-2	2分
B. PEG化IL-2 (10PEG* / IL-2)	10分
C. PEG化IL-2 (50PEG* / IL-2)	35分

すなわち、10PEG* / IL-2を用いるIL-2のPEG化は、細胞培殖アッセイにより測定した場合、マウスにおける粗粗半減期の5倍の延長をもたらし、そして50PEG* / IL-2を用いる場合、粗粗半減期の一回割的な17倍の延長をもたらす。

未修飾IL-2、PEG化IL-2 (10モルPEG* / モルIL-2の反応から)、及びPEG化IL-2 (50モルPEG* / モルIL-2の反応から)を、IL-2のタイプ当たり12匹のマウスに仰臥内注射した場合、IL-2の注射された合計ユニットに対する1.5分間に回収された生物活性の%は次に示す通りである。

これらの結果は、PEG*による修飾の程度によるIL-2生物活性の回収の%の劇的な増加を示し、IL-2のモル当たり50モルのPEG*の修飾レベルにおいて100%の回収が生ずる。

2. 皮下投与

無菌水中12.5mgの蛋白質を48匹のマウスに皮下投与した後に未修飾IL-2及びPEG化IL-2の凝乳助凝的データを得た。マウスにおいて肩甲骨皮下注射に使用されたサンプル(1個の100μlボルス)は未修飾IL-2、PEG化IL-2 (20モルPEG* / モルIL-2反応からの)、及びPEG化IL-2 (50モルPEG* / モルIL-2反応からの)を含有した。3組すべてのサンプルは0.125mg / mlであった。未修飾IL-2サンプルは、中性pHの水性溶液中に不溶性であるため、0.1%のSDSを含有した。

組々の時点において、100μlのサンプルを眼窩後よりヘパリン処理したチューブに前記の様にして取り出した。血漿を調製し、そしてバイオアッセイのためにアリコートを取った。45分間の時点では3組すべてのサンプルのそれぞれについて16匹のマウスを用いた。他のすべての時点においては、サ

ンプル当たり2~5匹のマウスを用いた。第4図は、マウスへの皮下注射の後の未修飾IL-2及びPEG化IL-2の凝乳助凝を示す。下に示す様に、注射された全IL-2活性の最大%がPEG化分子について非常に高く血漿中に見出されるのみならず、PEG化IL-2のクリアランス速度是有意に低下した(第4図を参照のこと)。

サンプル	血漿中に見出されるIL-2生物活性の最大%
A. 未修飾	0.5
B. PEG化IL-2 (20PEG* / IL-2)	7.0
C. PEG化IL-2 (50PEG* / IL-2)	17.5

F. PEG化IL-2及び未修飾IL-2の注射の後のラビットにおける免疫反応

この研究では、各群4頭のラビットからなる3群を用いた。A群は、前記の製造方法からの、未修飾の、ダイアフィルトレーション後のdes-alanyl,ser₁₋₁₈IL-2(ロットLP304)を注射されたラビットであった。B群は、上記の様にして20倍過剰のPEG*を用いてロットLP304から調整したPEG / IL-2を注射されたラビットであった。C群は、50倍過剰のPEG*を用いてやはりLP304から調整したPEG / IL-2を注射されたラビットであった。各IL-2粗物は注射の前に無菌水で稀釈した。

雌性ニュージーランド白色ラビット(体重約2.5kg)のそれぞれに、部位当たり0.5μl (1~2×10⁴ユニット)の該当

するIL-2又はPEG化IL-2を2部位において筋肉内注射した。

組々の時間間隔において、すべてのラビットの耳部の筋肉又は耳の中央の助筋から採血した。血液を凝固せしめ、そして遠心して血清を得た。血清のアリコートをIL-2アッセイ媒体中に5倍に稀釈し、そして例I. C. の細胞培殖アッセイによりバイオアッセイした。筋肉内注射後の循環血中のIL-2及びPEG化IL-2の凝乳助凝プロフィールはマウスについて得られたそれに類似していた。

上記の注射の後1週間に、すべてのラビットに、該当するIL-2又はPEG化IL-2を用いて第2シリーズの筋肉内注射を行った。

最初の注射の後3週間に、すべてのラビットに該当する未修飾IL-2又はPEG化IL-2を1~2×10⁴ユニット / kgで追加した。標識試薬としてホースラディッシュペオキシダーゼが過剰されたヤギ抗ラビットIgGを用いそして基質としてオルトフェニレンジアミンを用いるELISAアッセイにより、規則定間隔で血清(上記の様にして得られた)中で抗原特異的抗体反応を測定した。492nmにおける吸光を測定した。ダイナテック・ラボラトリーズ社から得られるポリスチレン及びポリビニルの2つのタイプのELISAプレート上に抗原をコートした。血清に対して試験した抗原は未修飾IL-2 (LP304)、PEG / IL-2 (20倍過剰PEG*)及びPEG / IL-2 (50倍過剰PEG*)であった。最初の注射の後5週間に結果は次の通りであった。

特表昭62-503171(11)

A群 これらのラビットはすべて、ELISAにおいて 10^4 ～ 10^5 への稀釀において見られる IL-2 特異的 IgM を生じさせていた。4ラビットの内の2頭 (A3及びA4) はまた、 10^4 稀釀まで高い IL-2 特異的 IgG を有していた。ラビット A2 はわずかに低いレベルの IgG を有していた。ラビット A1 は最低の IL-2 特異的 IgG を有していた。

B群 これらのラビットは検出し得る IL-2 特異的 IgG を生じさせなかった。すべてが、ELISA アッセイにおいて 10^4 稀釀まで検出される IL-2 特異的 IgM を有していた。これらのアッセイを、ELISA プレート上の抗原として PEG/IL-2 を用いて反復し、同じ結果が得られた。

C群 これらのラビットは検出し得る IL-2 特異的 IgG を有しなかった。すべてが、抗原として PEG/IL-2 を用いて行われた ELISA アッセイにおいて 10^4 稀釀まで検出される IL-2 特異的 IgM を有していた。

これらの研究は、PEG/IL-2 が抗原である場合に抗原特異的 IgG 反応が低下し、他方未修飾 IL-2 を用いる場合、抗原特異的 IgG が時間と共に出現することを示している。

G. Balb/c マウスにおける MethA を用いる PEG 化 IL-2 の効果の検討

マウスに毎日投与するこの実験においては、未修飾の IL-2 がわずかしか効果を示さない投与量において MethA 肉腫に対して非常に効果的であった。

66匹の Balb/c マウスのそれぞれに、スローン・ケック

リングから得られる 5×10^6 のメタコランセン-A (Methacholanthene-A) (MethA) マウス線維肉腫セルラインを Balb/c マウス中の腹水からの細胞懸液として、首の背部に皮下注射した。マウスを同様な数の大形、中形及び小形の腫瘍 (5 ～ 100 mm) を有する 3 群に分けた。次に、3 群に試験物質を腹腔内注射した。A 群には 0.01 ml/マウスの PEG (モノメチル 5000) を含有する 0.5 ml の PBS を与えた。B 群には 1.0 % のウシ血清 + IL-2 に対して 20 倍過剰の PEG* を用いて得られた 3 ml の PEG* / IL-2 を含有する組織培養地 0.5 ml を与えた。C 群には 1.0 % のウシ血清 + 前記の未修飾のダイアフィルトレーション後の 3 ml の des-alanyl-serine IL-2 を含有する組織培養地を与えた。

3 群に 7 日間にわたり毎日注射した。4 日目にマウスの体重を測定し、そしてそれらの腫瘍の体積を測定した。

8 日目には、3 群の体積が異っていた。

PEG 対照	26.0g
PEG* / IL-2	21.1g
IL-2	23.6g

	0 日	6 日	8 日	9 日
	腫瘍体積 (mm ³)			
A 群 (PEG 対照実験)	138 ± 48	3259 ± 919	5597 ± 1877	7333 ± 1403
B 群 (PEG/IL-2)	129 ± 42	424 ± 129	341 ± 218	353 ± 148
C 群 (IL-2)	130 ± 63	2523 ± 808	2034 ± 997	4405 ± 1471

して凍結乾燥した。得られる粗製された生成物を今後 PEG* と称する。

B. IL-2 への PEG* の接合

この例のために、米国特許 No. 4,518,584 及び No. 4,572,798 (前掲) に記載されている様にして粗製された des-alanyl-serine IL-2 を使用した。1.0 ml の緩衝液 (0.1 M 酢酸ナトリウム、pH 9、0.1 % SDS) 中 0.4 ml のこの粗製された IL-2 に、1 モルの IL-2 当り 1.0 モルの PEG* のモル比で、新しく調製された水性 PEG* を加えた。十分に混合した後、この溶液を 32 ℃ にて 15 分間、1 時間、5 時間及び 20 時間搅拌した。各時点において 125 μl の溶液を取り出し、そして 4 ℃ にて貯蔵した。

C. PEG 化 IL-2 の特徴付け

反応 B からの生成物の SDS-PAGE (1.4 %、没元) 分析は、15 分間までに実質的な IL-2 の修飾が生じたことを示した。

例 I. C. において前記した IL-2 細胞培養バイオアッセイによりインピクトロで試験した場合、PEG-350 IL-2 は活性であった。

D. マウスにおいて未修飾 IL-2 と比較した PEG 化 IL-2 の免疫効能

例 II. E. において前記したのと同様にして、免疫効能分析のため、PEG-350 IL-2、及び未修飾 IL-2 をマウスに筋肉内注射した。結果を第 II 表に示す。

8 日目において、配合された IL-2 により処理されたマウスは 64 % の腫瘍増殖阻害を示した。しかしながら、9 日目までに腫瘍は 40 % に過ぎず、そして腫瘍は急速に成長した。これらの群は苦痛を除去するために殺した。PEG* / IL-2 で処理されたマウスは 8 日目及び 9 日目の両方において 94 % の腫瘍の増殖阻害を示した。これらのマウスもまた苦痛を除去するために殺した。

例 III

分子量 350 の PEG による PEG 化 IL-2 の調製

A. PEG-エステルの調製

分子量 350 の PEG の線状モノメチル置換エステルを次の方法により得た。

アルドリッヂ・ケミカル社製の合計 1.0 g のモノメチル PEG 350 を 110 ℃ に加熱した。これに 14.8 g の無水コハク酸 (アルドリッヂ) を加えた。この混合物を 110 ℃ にて一夜搅拌し、そして次に冷却した。ベンゼンを添加し、そしてベンゼン溶液を過濾した。試験を濁液から早離した。

得られた PEG-350-サクシネット 2 g を 2.5 ml のジメチルホルムアミド、3.531 g のジクロロヘキシルカルボジイミド、及び例 I に記載した様にして調製した 6.914 g の HNSA と混合した。この混合物を室温にて 48 時間暗中で搅拌し、そして過濾した。この濁液に 1 % のエーテルを徐々に添加して試験を洗浄せしめた。合計 150 ml の粗混合物を 1 ml の水に加え、遠心し、そしてデカントした。上清を水中セファデックス G-25 カラムに適用し、そして適切な面分をプールし、そ

第 II 表
PEG化 IL-2 (PEG-350 IL-2) の調理効能

時 間	BRMP標準ユニット ^a / 回収%	
	未修飾 IL-2	IL-2 PEG
0 分 (注射された全ユニット)	176.913	80.046
1.5 分	81.880/ 46.3	25.035/ 31.3
8 分	9602/ 3.43	3158/ 3.94
20 分	4850/ 2.80	2772/ 3.46
45 分	1178/ 0.67	564/ 0.70
1 時間	212(2)**/ 0.12	129/ 0.16
2 時間	46(2)**/ 0.03	0
3 時間	0	0

* これらの値はマウスにおけるユニット (BRMPユニット × 20 倍稀釈) である。
** カッコはその群中に 4 倍より少數のマウスがいる場合を示す。

例 IV

分子量 400 及び 1000 の PEG を用いる PEG 化 IL-2 の調製

分子量 400 及び 1000 の線状ジヒドロキシ (非還換) PEG の IL-2 調製体を、それぞれ非還換 PEG-400 及び PEG

特許昭 62-503171 (12)

PEG-1000 を用いて例 III に記載した方法を一般的に使用して調製した。

例 V

分子量 10,000, 20,000 及び 35,000 の PEG による PEG 化 IL-2 の調製

分子量 10,000 の線状モノメチル還換 PEG の IL-2 調製体を、ユニオンカーバイド與 PEG 10,000 を用いて例 I.A. に記載した方法に一般的に従って調製した。分子量 20,000 及び 35,000 のジヒドロキシ PEG の IL-2 調製体を、フルカボンの PEG-20,000 及び PEG-35,000 を用いて、例 I.A. において省略した Abuchowski 等 (前掲) に類似する方法 (上昇した温度ではなく室温において溶剤中で塩基を使用する) に従って得た。得られる変形された IL-2 蛋白質は前記の細胞増殖アッセイによりアッセイした場合生物活性であった。

例 VI

PEG-5000 を用いる PEG 化インターフェロン-β (IFN-β) の調製

活性化された PEG-エステルの調製、及び米国特許 No. 4,518,584 に記載されている様な 1 位のシスティン残基がセリン残基によって置き換えられている SP-HPLC 精製された組換 IFN-β (ser1, IFN-β) への前記活性化された PEG-エステルの接合を、1 モルの IFN-β 当り 0, 10, 20 又は 50 モルの PEG^c を含む反応において、例 I.A. 及び I.B. において IL-2 について記載したのと本質的に同じ方法により行った。未修飾 IFN-β からの PEG 化

IFN-β の分離は、0.1% SDS を含む 5.0 mM 酸性ナトリウム (pH 5) 中セファクリル S-200 カラムを用いる分子排除クロマトグラフィーを用いて達成することができる。S-200 百分率からのアリコートを、H.E. Stewart, "The Interferon System", Springer Verlag, 17-18 頁 (1978) により一般的に記載されている細胞変性効果 (cytopathic effect; CPE) アッセイを用いて IFN-β 抗ウイルス活性についてアッセイし、そして例 VI に記載する様に活性であることが見出された。

CPE アッセイは、インターフェロンがそれにより処理された細胞をウイルスの効果から保護するという原理に基いて機能する。ウイルスに対してより耐性である細胞は生存し、他方ウイルスに対して感受性である細胞は細胞変性効果を経験し、そして死ぬであろう。

例 VII

PEG-5000 により修飾された PEG 化 IFN-β の特徴付け

A. 各々の PEG^c 対 IFN-β モル比の反応からの修飾された IFN-β 生成物のサイズの特徴付け
1 分子の IFN-β 当り 0, 10, 20 又は 50 分子の PEG^c を含む例 VI に記載した反応からの生成物の SDS-PAGE (14 %、非還元的)、IL-2 の場合の様に、PEG^c 対 IFN-β のモル比の増加に伴う修飾の程度の増加を示す。デンシトメータースキヤン (第 5 図) は、PEG^c 対 IFN-β のモル比の増加に伴う 20,000 の分子量で働く未変性 IFN-β の量の減少を示す。30~35,000 の見かけ分子量を有する明瞭

な 1 程が修飾された 3 程類すべての分子比 (10 PEG^c / IFN-β, 20 PEG^c / IFN-β, 及び 50 PEG^c / IFN-β) の PEG 修飾の後に存在した。おそらく一層高濃度に修飾された IFN-β 和を代表する一層高分子量の和の増加が 1 分子の IFN-β 当り 50 分子の PEG^c で行われた反応において明らかであった。

B. 未修飾 IFN-β に比較した PEG 化 IFN-β の生物活性

1 モルの IFN-β 当り 0, 10, 20 又は 50 モルの PEG^c を含有する PEG 化反応の S-200 分離の画分を例 III に記載されている様にして抗ウイルス活性についてアッセイした。3 程類すべての修飾反応から得られた PEG 化 IFN-β の生物活性は第 III 表に示す様に未修飾 IFN-β に匹敵した。

第 III 表

CPE アッセイにより測定した場合の未修飾 IFN-β 及び PEG 化 IFN-β の生物活性

IFN-β モル当り 最初に添加した PEG ^c のモル数	生物活性 (ユニット / mg)
0	2.2 ± 0.6 × 10 ³
10	2.2 ± 1.6 × 10 ³
20	2.0 ± 0.1 × 10 ³
50	4.1 ± 0.8 × 10 ³

C. 未修飾 IFN- β に比較した PEG 化 IFN- β の溶解性

修飾反応及び S-200 百分の後、PEG 化 IFN- β 及び未修飾 IFN- β のすべてをそれぞれ pH 7 に調整し、例 I に記載したと同様にしてセファデックス G-25 クロマトグラフィーを用いて SDS を除去した。200~650ng の吸光スキャンにより示される様に PEG 化 IFN- β は溶液状に維持されたが、未修飾 IFN- β は pH 7 において溶液から沈澱した（第 7 図）。修飾された IFN- β 及び未修飾 IFN- β の両者は pH 9 において可溶性であった。試験されたすべての PEG 化 IFN- β サンプルについて同様の結果が得られた。

D. 未修飾 IFN- β に比較した PEG 化 IFN の物理的性質

PEG 化 IFN- β を用いた場合未修飾 IFN- β に対して、ラット及びマウスにおいて、IL-2 のそれと同様にインビボ半減期が改善された。

例 VI

PEG 化リシン A の調製及び特徴付け

A. PEG 化リシン A の調製

調製にかけるため及び細胞毒性を示すために可溶化を必要としない可溶性の組換リシン A を下記の方法に従って調製した。リーダー配列がリーダー/リシン A キメラの N-末端部分である段に仮想的融合ペプチドを形成するためにリシン A のコード配列が *phoA* のリーダー配列をコードする DNA と直接リーディングフレーム内に記された場合、この様に記載さ

れたりシン A 配列は可溶性の細胞毒性物質をもたらす。

phoA (1986年3月7日に寄託されたATCC寄託No 63,027)、*pRT17* (1986年3月7日に寄託されたATCC寄託No 67,026)、及び *pRT32* (1986年3月7日に寄託されたATCC寄託No 67,025) 中に含まれる前駆体蛋白質のための遺伝子を含有する発現ベクター又はこれらの変異形を形成した。これらの発現ベクターによる宿主細胞の形質転換がコードされた前駆体蛋白質の可溶化をもたらした。*aro-aro* 変形された前駆体をトリプシンにより開裂せしめ、ここに記載する様に前駆体の A 部分及び B 部分を別個の蛋白質として調査した。

phoA 発現系において、必須成分は、リシン A コード配列の上流にあり、ここに近位にありそしてフレームが合っていない（リシン A コード配列は ATG コドンにより開始される）停止された *phoA* リーダー配列である。言うまでもなく、2 つのコード配列は完全な細胞プロモーターを備えていなければならず、これはリーダーにすでに結合している *phoA* プロモーターであった。さらに、B. チューリングエンシス (*B. thuringiensis*) の結晶蛋白質と関連する正のレトロレギュレーター配列である正のレトロレギュレーター配列の存在により生産が改良された。これはレブリコン及び選択マーカーを含む細胞毒性送ベクター上に記された。

次に、これらのベクターを使用して適当な原核性宿主を形質転換し、この宿主を、選択された特定の宿主のために適切な条件下で、最もしばしば、発現系の制御のもとに記されたプロモーターが制御される条件下で培殖せしめる。次に、選

択されたプロモーターの制御のもとで発現を行う条件を与えることによってリシン A の生産を誘導し、そして生成物の所産の収量が得られるのに十分な時間にわたって生産を進行せしめた。次に、細胞を破碎することにより蛋白質生成物を単離し、そして細胞破片を除去した。次に自由に溶解する蛋白質に適用されるものとして当界面において知られている標準的技法を用いて、生産された蛋白質をさらに精製した。しかしながら、抽出及び精製の効率は、部分精製された抽出物をフェニルセファロースで処理することにより増強された。音波処理物中のリシン A（既又は他の結合物から一旦分離されたもの）の溶解度は、音波処理物を西洋の 100,000×g にて 30 分間遠心分離して不溶性蛋白質を回収沈降せしめた場合におよぶに及ぶその能力により示した。

合計 2 μl のこの可溶性リシン A (9.0 μl / μl) を、2 μl の新鮮な β -メルカプトエタノールを加え (0.1 %) そして室温にて一夜インキュベートすることにより還元した。2 μl の還元されたリシン A を、0.10M NaPO₄ (pH 8.0) で平衡化された G-25 カラム (ファルマシア) に適用し、次に 0.5 μl の緩衝液によりサンプル適用容量を 2.5 μl とした。次の 3.0 μl の溶出液（緩衝液を適用した）を股塩されたリシン A として算めた。

1.0 μl の脱脂されたリシン A (約 6 μl) を 1.5 μl のミクロフェージチューブに移した。このリシン A に、例 I. A. において記載したようにして得られたポリエチレンジリコール 2000 の N-ヒドロキシサクシニミドエステル (活性化され

た PEG) 4.5 μl を加えた。4.5 μl の活性化された PEG はリシン A に対して 1.1 倍過剰の活性化された PEG を意味した。

活性化された PEG を、おだやかに混合することによりリシン A 構造に溶解した。和々の時点において、反応混合物の 100 μl のアリコートを次の方法により G-25 カラム上で脱脂して未反応の活性化 PEG を除去しそして PEG 化反応を停止せしめた。

100 μl の PEG / リシン A を適用し、

2.4 μl の 0.10M NaPO₄ (pH 8.0) を適用し、

1.1 μl の 0.10M NaPO₄ (pH 8.0) を適用し、

そして、溶出液を脱脂されたリシン A として算める。

採用した時点は、10 分、20 分、30 分、45 分、1 時間、2 時間、3 時間、4 時間、及び 5 時間であった。

反応混合物は 0 時から氷上に維持した。

PEG 化の程度を決定するために 1.5 % ミニゲルを流した。その結果、PEG 化は良好に行われそして反応は急速に生ずる様であった。

PEG 化リシン A の新サンプルを抗体への接合のために調製した。約 40 μl の上記のリシン A を、1 % の β -メルカプトエタノールを含有する約 1.0 μl の Tris 緩衝液 (pH 8.5) と混合した。これを約 5 μl に縮締し、そして 2 本の G-25 カラム上 EDTA 緩衝液中で脱脂して 6.37 μl の前溶出液を得た。

PEG (約 2000) の N-ヒドロキシサクシニミドエステル 合計 24.6 μl をリシン A に加え、そしてこの混合物を氷上で

15分間反応せしめた。(これは、10倍過剰の活性化されたPEGに相当する。)

PEG化リシンAを3本のG-25カラム上で脱塩し9.70 mlの最終溶出液容量を得た。 β -メルカプトエタノールを5 ml(約0.05%)に添加した。PEG化リシンA混合物を4℃にて貯蔵した。

合計5.0 mlのPEG化リシンA混合物を分取用Zorbax GF-250 サイズ分離カラム(デュポン)に、1 ml/分の流速で、5.0 mM (NH₄)₂SO₄、5.0 mM NaPO₄(pH 6.5)の洗浄液を用いて注入した。

分取用分画の5 ml画分の13.5%ミニゲル処理により決定した場合、最初のピークはPEG化リシンAであった。

最初の試行において得られたブールを約2 mlに縮締し、そして次に280nmの吸光をモニターすることによりZorbax GF-250 カラム上でRPLCにより粗留した。各試行の回分15~23をPEG化リシンAとしてブールした。

次に、PEG化リシンAの分子量を、前記の粗留方法に類似する条件下でRPLCにおいて分子量標準(ビオーラド)を移動せしめることにより決定した。線形回帰を行い、PEG化リシンが約22 K(1量体)、44 K(2量体)、及び59 K(多量体)の見かけ分子量を有することが示された。

B. PEG化リシンAの特徴付け

Zorbax GF-250で処理した2 mlのPEG化リシンAからのアリコートを、プロメガ・プロテク(ProMega Biotec)製のキットを用いて、網状赤血球アッセイ(翻訳)における生

を室温にて5, 5'-ジチオピス-(2-ニトロ安息香酸)と反応せしめ、そして次に冷却し、そして次に抗体分子当たり2.5のIT分子を与えるのに十分な2-イミノチオラン(1T)を加えた。

合計166 mlのプロビレングリコールを0.84 mlのIT-誘導体化抗体に加えた。2.32 mlの上記のPEG化リシンAを加えて接合反応を開始した。混合物を室温にて2時間インキュベートした。

接合反応混合物を、Zorbax-GF-250 サイズ分画(ゲル通過)RPLCカラムに適用し、0.15M NaPO₄(pH 8.0)の溶出液を用いた。カラムからの粗留された免疫接合体の合計7.8%の回収が得られた。

D. 接合体の特徴付け

1. リボゾーム翻訳アッセイ

接合体ブールを無菌フードのもとで無菌チューブ中に滤過除菌し、このチューブからアリコートを粗々の無菌ミクロフュージチューブに無菌的にピベット送付した。最終無菌化イムノトキシンの100 mlのアリコートを、ラビット網状赤血球からの粗留された抽出物、³⁵S-メチオニン、³²P RNA及び³²P RNA合成のための他の要素と共にインキュベートした。リボゾーム翻訳の阻害剤を伴わないで、及び伴ってアッセイを行った。投与量応答曲線は蛋白質合成を測定する。対照サンプルは非PEG化イムノトキシン、リシンA、及びPEG化リシンAを含む。結果は次の通りであった。

特許昭62-503171(14)

物活性について試験した。与えられたサンプルは四分28(高分子量)、34(2量体)、40(单量体)、及び幾つかの未精製PEG化リシンA/未修飾リシンA混合物であった。ラビット網状赤血球無菌細胞系アッセイは、放射性メチオニンの取り込みにより蛋白質合成を測定する。

第IV表に示される結果は、粗留された单量体のみが遊離リシンAのそれに接近する阻害を示すことを示した。2量体及び多量体部分は50%における阻害投与量(ID50)の上昇により測定した場合、非常に低下した阻害を示した。

第IV表

材料	ID50(ng/ml)	ID50(M)
リシンA	0.16	5.2×10^{-11}
高分子量	158.5	5.2×10^{-9}
2量体	5011.9	-
单量体	3.16	103.6×10^{-11}

すなわち、リシンをPEG化して单量体のみを生成せしめ、そして混合物から多量体を除去する必要があるようである。

PEG化の溶解性の利点は確実された。すなわち、PEG化リシンAの2.0 ml/mlへの粗留の形成はPEG化されていないリシンAを用いては不可能であった。

C. 抗体へのPEG化リシンAの投与

520C9と称する乳癌モノクローナル抗体は1985年1月8日に、アメリカン・タイプ・カルチュア・コレクション、ロックビル、MDにNIBB8696として寄託されている。この抗体

試験材料	ID50(リシンA 鏡に基くM数)
リシンA鏡	5.9×10^{-11}
PEG化リシンA鏡	52.0×10^{-11}
リシンA鏡と520C9との接合体	60.8×10^{-11}
PEG化リシンA鏡と 520C9との接合体	141.0×10^{-11}

このアッセイは、PEG化接合体及び非PEG化接合体のID50がそれぞれ15.85及び7.94 ng/mlであることを示した。このアッセイの精度はおよそ±100%より良くはないため、両者の阻害は同じである。リシンA鏡への抗体のみの付加は非接合リシンAに比べてID50を減少せしめる様である。すなわち、PEG化は抗体の付加以上にリシンA活性を阻害しない。トキシンのみのPEG化ではなくイムノトキシンのPEG化が結果を改良すると予想される。

2. インビオ細胞変性アッセイ

1 mlの培地に4000個の乳癌細胞(公衆が入手可能なセルラインSKBR3から)を、1セットの8 mlガラスバイアルに加え、次にPEG化接合体細胞及び非PEG化接合体細胞(100 ml/mlのウシ血清アルブミン(BSA)を含有するリソ酸塩緩衝液(PBS)中)を加えた。37℃にて22時間インキュベートした後、培地を吸引除去し、单層をPBSで洗浄し、そしてメチオニン不含有培地に³⁵S-メチオニンを添加したものを加えた。バイアルを37℃にて2時間さらにインキュベートし、培地を除去し、そして細胞を1 ml/

のメチオニンを含有する 10% のトリクロロ酢酸 2 ml により 2 回洗浄した。細胞を乾燥し、シンチレーション流体を加え、そしてシンチレーションカウンター中で放射能を測定した。細胞変性を、対照（未処理）の蛋白質合成の 50% (TCID₅₀%) をもたらす接合体の組培殺菌率と置換として表現した。

アッセイの結果は次の通りであった。

接合体	ICID ₅₀ % (nM)
非 PEG 化	0.216
PEG 化	< 0.422

このアッセイの精度もまた約 ± 100% より良好ではなく、そしてそれ由に両者の TCID₅₀ 値は同一である。細胞毒性の観点から、殺菌段階はリシン A 様活性を含むのではなく、他の手段、最も高い可能性として接合体結合、トランスロケーション、及び／又は細胞内移動を含むであろう。

例 IX

ポリオキシエチル化グリセロール (POG) により修飾された IL-2 の調製及び特徴付け

A. 活性 POG - IL - 2 の調製

分子量 5000 のポリオキシエチル化グリセロール (POG) はポリサイエンシス (Polysciences) により柱間合成されたものである。10 g の POG に 2.28 g の無水グルタル酸 (POG に対して 10 倍過剰) を加えた。この混合物を 110

℃ にて 2 時間攪拌しそして冷却した。これを 20 ml の CHCl₃ に溶解し、そして微しく攪拌しながら 500 ml のエーテル中に徐々に注いだ。生成物を虹吸、エーテルですすいで約 90% の POG - グルタレート生成物を得た。この生成物を、例 I. A. に記載したようにして N-ヒドロキシサクシニミドと反応せしめることにより活性エステルである POG - グルタリル N-ヒドロキシサクシニミド (POG*) を得た。次に、例 I. B. に記載した様に、0.1 M 硫酸ナトリウム (pH 9)、0.1 M SDS 中 0.25 ml / 1 L - 2 の溶液 20 ml を 5 ml の POG* と室温にて 30 分間反応せしめた。

10 ml の反応混合物を 2 ml に濃縮し、そして 10 mM 硫酸ナトリウム (pH 9) 中セファデックス G - 25 カラムに適用した。これを pH 7 に調整し (溶解) そして浓缩した。2 ml の濃縮物に 1.7 M (NH₄)₂SO₄、5.0 mM リン酸ナトリウム (pH 7) から成る溶剤を加えた。次に、これを 0 ℃ にてフェニル - TSK カラムに適用した。画分の SDS-PAGE (14%、還元) は良好な分離を示した。

他の 10 ml の POG - IL - 2 を pH 5 に調整した後に 3 ml に濃縮した。これをセファクリル S - 200 カラムに適用した。画分の SDS-PAGE (14%、還元) は均一な POG - IL - 2 生成物を示した。

B. POG - IL - 2 の特徴付け

反応混合物の S - 200 分離からの画分を例 I. C. に記載した様にして生物活性についてアッセイした。結果を第 V 表に示す。

第 V 表

サンプル	生物活性 (BRMP 標準ユニット / mg IL-2)
未修飾 IL - 2 (平均)	1.2 × 10 ⁴
最大量の POG - IL - 2 を含む 2 個のプールされた画分 (平均)	1.5 × 10 ⁴

登録

リシン A 様を調製するために使用されたプラスミド及び抗体 520C9 を生産するハイブリドーマは、アメリカン・タイプ・カルチュア・コレクション (ATCC)、12301 パークラウンドライブ、ロックビル、メリーランド、20852-1776、米国、に寄託された。寄託されたサンプルの ATCC 受託番号及び寄託日は次の通りである。

ベクター / ハイブリ ドーマの名称	寄託日	受託番号
520C9	1 / 8 / 85	BB 8696
PBT3	3 / 7 / 86	67.027
PBT17	3 / 7 / 86	67.026
PBT38	3 / 7 / 86	67.025

上記の寄託は ATCC とこの特許出願の承認人であるシタス・コーポレイションとの間の契約に基いて行われた。ATCC との契約は、これらのプラスミド及びセルラインの子孫の永久的入手可能性を公衆に対して、該寄託又は公衆を記載せしめて特定している米国特許が発せられた後、又は米国もしくは外

国の特許出願が公衆に公表された後に、どちらが先に到来するかにかかわらず与え、そして、これらのプラスミド及びセルラインの子孫の入手可能性を、米国特許商標局長官により 35 USC 8 122 及びこれに基く長官規則 (88806638 への特別の旨及を伴う 37 CFR 8 1.14 を含む) に従って定められた者に与える。この特許出願の承認人は、寄託中のプラスミド及びセルラインが適切な条件下で培養された場合に死滅し、失われ又は破壊された場合には、追知の後これらが同じプラスミド及びセルラインの生存培養物によりすみやかに置き換えられることに同意する。

要約すれば、この発明は、PEG ホモポリマー又はポリオキシエチル化ポリオールに選択的に接合されそしてそれによって生理的 pH における水性媒質中に可溶化されているか又は一層可能性にされている生物学的に活性な特定の蛋白質がこのような媒質中に溶解している医薬組成物を提供するものと見られる。接合は、通常疎水性である水不溶性の蛋白質を pH 6 ~ 8 の水に可溶性にするために役立つのみならず、その生理的半減期を延長し、そして通常疎水性である蛋白質の凝聚を減少せしめもしくは除去することにより又は抗原決定基をシールすることによりその免疫原性を低下せしめる。接合を伴わない場合、蛋白質は洗剤又は変性剤のごとき可溶化剤の添加により、安定剤の添加と組合わせて pH を上げることにより、あるいは pH を下げることにより溶解されなければならない。

以上の記載は、当業者がこの発明を実施するのに十分である。

ると考えられる。寄託された具体例はこの発明の1つの限点の異なる例であると考えられ、そして機能的に同等なすべてのプラスミド及びセルラインはこの発明の範囲に属するところが意図されるから、この発明は寄託されたプラスミド及びセルラインの範囲に限定されない。この発明における材料の寄託は、この明細書の記載が、最もの形態を含むこの発明のすべての観点の実施を可能にするのに不適当であるとの自白を構成するものではなく、これらは請求の範囲をそれらが示す特定の例示に限定するものとして理解されるものでもない。

特表昭62-503171(16)

FIG. 1

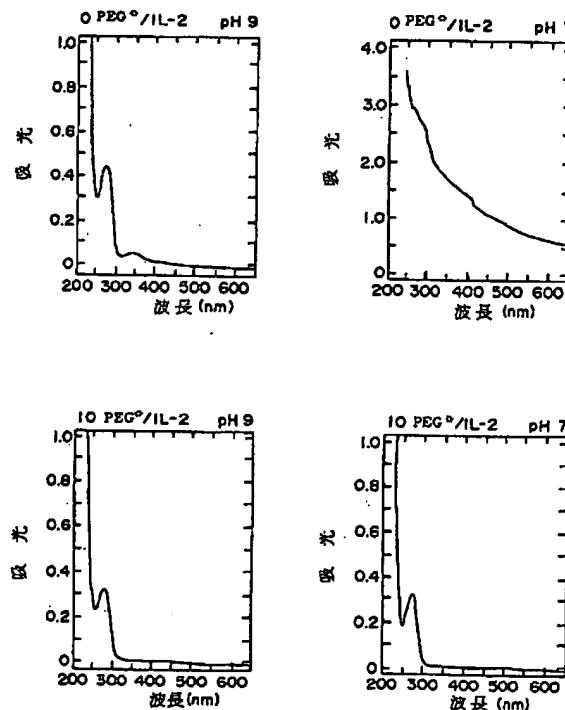
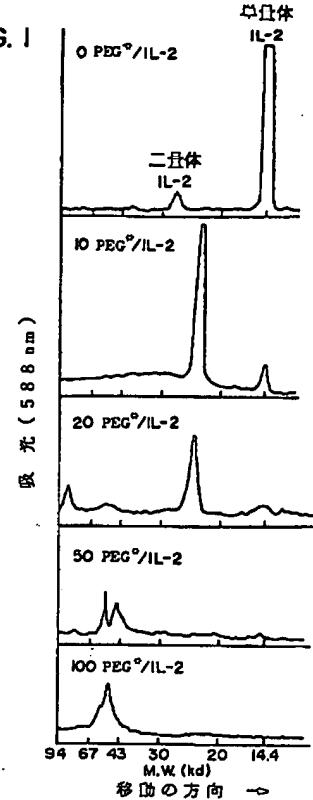


FIG. 2

IL-2の生物活性 (t = 1.5分の活性を100%とする)

FIG. 3

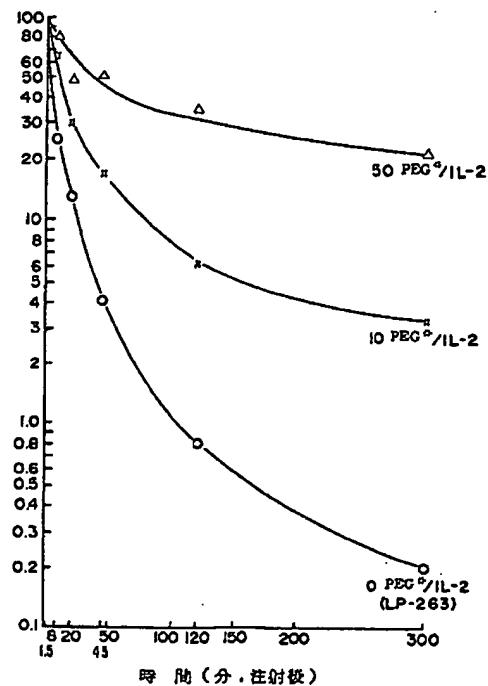


FIG. 4

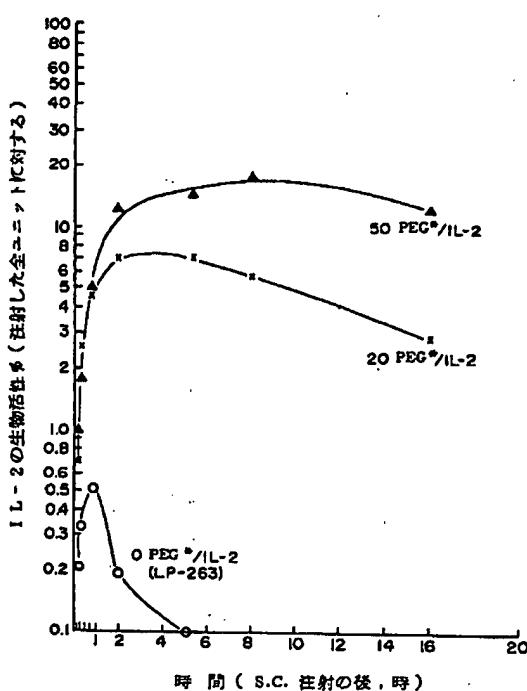


FIG. 5

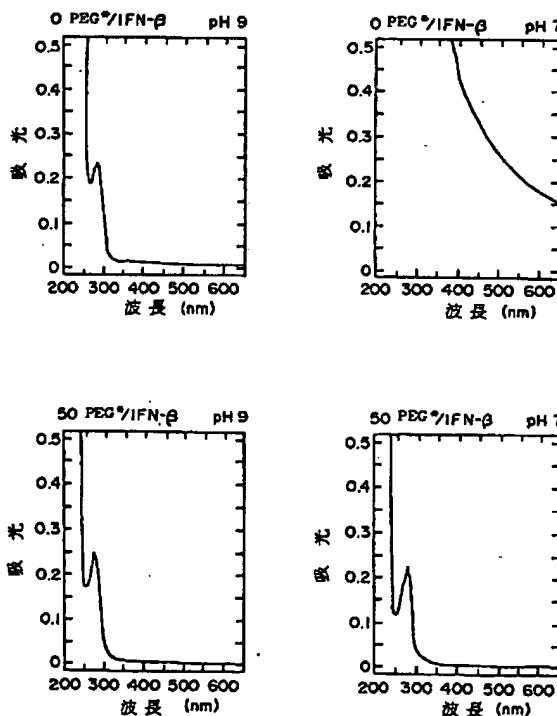
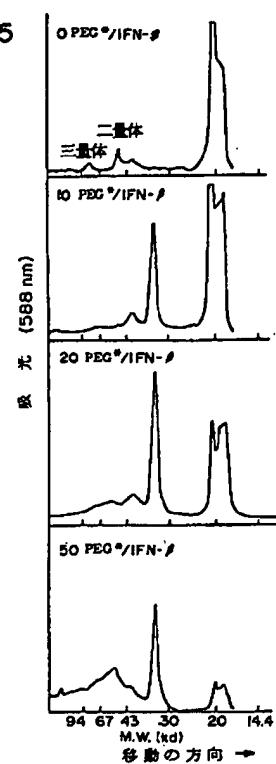


FIG. 6

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IN 30000 classification symbols (see page 49)		International Application No. PCT/US 86/01252	
According to the International Classification of Patent Literature (IPC)			
IPC: A 61 K 47/00; A 61 K 45/02; A 61 K 37/03; A 61 K 39/393;		IPC: C 07 K 17/08	
II. FIELDS SEARCHED			
Monographs/Compendia/Standard Books		Classification Schemes	
Classification System		Classification Schemes	
IPC ⁶		A 61 K; C 07 K	
Informational documents other than International Publications to the extent that such documents are indicated in the Patent Search Report			
III. DOCUMENTS DECLARED TO BE RELEVANT			
Category ⁷	Character of Document ⁸ , with reference, where appropriate, of the relevant passage ⁹	Report to Claim No. 14	
P,X	EP. A. 0154316 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES) 11 September 1985, see the claims; page 3, lines 24-27; page 6, lines 2-11; page 9, lines 3-14	1,2,4-10	
V	cited in the application	3	
V	Chemical Abstracts, volume 101, no. 15, 8 October 1984 (Columbus, Ohio, US) A. Abuchowski et al.; "Synthesis, characterization and chemically modified antisense T. Antitumor properties of polyethylene glycol-asparagine conjugates", see page 39, abstract 122678c, & Cancer Biochem. Kinophys. 1984, 7(2), 175-85	3	
V	cited in the application	3	
A	EP. A. 0095110 (NIKON CHEMICAL RESEARCH K.K.) 11 January 1984, see the claims cited in the application	1-10	
A	US. A. 4414147 (A.M. KLEIBANOV et al.) 8 November 1983, see the claims and example 3 cited in the application	1-10	
<p>⁶ Broadest interpretation of these documents: "A document which discloses the same or substantially the same subject matter as the claimed invention and which is not to be regarded as an application for a patent or as a patent reference document but published on or after the International filing date of the application for which the International application is filed".</p> <p>⁷ "Search categories" are the categories of documents which are relevant to the search. They are not necessarily the categories of documents which are relevant to the examination of the application.</p> <p>⁸ "Character of document" is the classification of the document according to the International Classification of Patent Literature (IPC).</p> <p>⁹ "Relevant passage" is any part of a document which discloses the claimed invention or which is of interest in connection with the examination of the application.</p>			
<p>¹⁰ "Other documents published after the International filing date which are relevant to the examination of the application and which are not to be regarded as an application for a patent or as a patent reference document but published on or after the International filing date of the application for which the International application is filed".</p> <p>¹¹ "Document of particular relevance": the claimed invention is based on the disclosure of this document and the examination of the application is dependent on this document.</p> <p>¹² "Document of relevance": the claimed invention is based on the disclosure of this document and the examination of the application is not dependent on this document.</p> <p>¹³ "Document which is relevant to the examination of the application but which is not based on the disclosure of this document".</p> <p>¹⁴ "Document member of the same patent family".</p>			
IV. CATEGORIZATION			
Date of the Actual Completion of the International Search		Date of Filing of the International Search Report	
18th September 1986		23 OCT 1988	
International Searching Authority		Signature of International Search Authority	
EUROPEAN PATENT OFFICE		M. VAN MOL	

特表明 62-503171 (18)

International Application No. PCT/US 86/01232

DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (EXCERPTS FROM THE SEARCH REPORT)		
Category	Country of Document, and indication, where appropriate, of the relevant content	Reference to Document
A	US. A. A179337 (P.F. DAVIS et al.) 18 December 1979, see the claims cited in the application	1-10

Form PCT/ISA/10 (1980 Edition, January 1980)

ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT ON

INTERNATIONAL APPLICATION NO. PCT/US 86/01232 (SA 13566)

This Annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The numbers are as contained in the European Patent Office EDP file on 02/10/86

The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A- 0194316	11/09/83	NO-A- 8503924	12/09/83
		NO-A- 8503966	12/09/83
EP-A- 0098110	11/01/84	JP-A- 58225025	27/12/83
		JP-A- 59059629	05/04/84
US-A- 4414147	08/11/83	None	
US-A- 4179337	18/12/79	NL-A- 7409770	22/01/75
		DE-A-C 2433883	05/02/76
		FR-A-B 2313939	07/01/77
		GB-A- 1469472	06/04/77
		CA-A- 1003873	27/06/78
		JP-A- 5609507	16/04/75
		CH-A- 614962	05/02/70
		SE-A- 7409366	21/01/75
		SE-B- 441753	04/11/83

For more details about this annex:
see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82